



TITLE:

分子進化法によるTranscription activator-like effectorの機能拡張(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

辻, 将吾

CITATION:

辻, 将吾. 分子進化法によるTranscription activator-like effectorの機能拡張. 京都大学, 2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20306>

RIGHT:

京都大学	博士（薬科学）	氏 名	辻 将吾
論文題目	分子進化法によるTranscription activator-like effectorの機能拡張		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>任意の塩基配列に結合するようにデザイン可能なDNA結合タンパク質は、遺伝子転写制御や遺伝子改変など生命科学技術への応用が可能である。Transcription activator-like effector (TALE)は、34アミノ酸から成るユニットが繰り返される領域を含んだタンパク質であり、繰り返しユニットひとつが標的DNAの1塩基を認識することでDNAに結合する。各繰り返しユニットは12、13番目のアミノ酸以外は保存されており、この2アミノ酸（可変アミノ酸）の配列によって、各ユニットが認識する塩基が決定される。このため、異なるユニットを組み合わせるだけで任意の塩基配列に結合するTALEを設計することができる。しかし、TALEが標的DNAに効率的に結合するためには、繰り返しユニットによって認識される塩基配列に加えて、5'末端側にTが必要であるという制限がある。またDNA塩基は様々な修飾を受けることが知られているが、修飾塩基を選択的に認識するTALEユニットは報告されていない。本研究では、これらの問題点を解消し、より自由に標的配列を選択することができるTALEタンパク質の創出を目指した。</p> <h3>第一章 5'末端塩基非依存的TALEの創製</h3> <p>効率的なTALEの結合には、標的DNAの5'末端塩基がTである必要がある。このため、Tを含まない領域にはTALEを結合させることが出来ず、5'末端T（5'-T）要求性はTALEを利用する上での最大の制限となっていた。一方で、TALE-DNA複合体の結晶構造から、リピート-1と呼ばれる繰り返しユニット類似構造部分が5'-T認識に関与していることが示唆されていた。そこで本章では、リピート-1を改変することで、5'-T制限をもたないTALEの創製を試みた。まずリピート-1へヘアピンループ構造中で、特に5'-T近傍に位置しているW232を他の19種のアミノ酸に置換した。置換体に関して、DNA結合能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。しかし、いずれの置換体においても5'-T以外の配列への結合性の上昇はみられず、5'末端塩基認識様式を変えるにはW232の置換だけでは不十分であることがわかった。次にリピート-1のヘアピンループ構造全体をランダム化し、大腸菌を用いた1-ハイブリッドスクリーニングにより5'-T以外の配列に対して結合性を示す変異体の選出を行った。得られた変異体に関してDNA結合能を評価した結果、変異体では5'-T配列に対する結合性はわずかに低下したが、5'-T以外の配列に対する結合能の上昇が見られ、5'-T/A/G/Cいずれの配列に対しても十分高い結合能を示した。5'末端塩基非依存的なTALEが創製できた。</p> <h3>第二章 メチル化シトシン選択的結合TALEの創製</h3> <p>5位メチル化シトシン（5mC）は、癌化、発生、分化など様々な生命現象に関わっている。しかし、メチル化が生じるタイミングや、メチル化状態の変遷、それらと生命現象との関連に関しては未だ不明な点が多い。これは生細胞内で個々の5mCを直接認識できる分子ツールが存在しないことに起因する。そこで本章では、既存TALEユニットに改変を加えて5mC選択的なユニットを創製し、TALEを5mC認識ツールとして応用することを試みた。5mCを標的としたスクリーニングを行うため、大腸菌が恒常的に発現しているDNAメチル化酵素であるDcmメチラーゼに着目した。この酵素はCCTGG配列中の2番目のCをメチル化する。そこで、CCTGGを含む配列を標的とするTALEを設計し、メチル化を受けるCを認識するユニットの可変アミノ酸周辺部位にランダム化した。このライブラリーから大腸菌を用いた1-ハイブリッドスクリー</p>			

ニングにより5mC結合性を持つユニットの選択を行った。得られた候補ユニットに関して、DNA結合能を評価し、高い5mC選択性をもつユニットを選出した。次にこの人工ユニットを用いて細胞内ゲノムの5mC部位を標的としたTALEを作製した。このTALEと転写活性化ドメインを融合することで人工転写因子を作製し、標的内在遺伝子のメチル化状態依存的な活性化を試みた。その結果、標的部位が非メチル化状態の細胞群に比べて、メチル化細胞群において有意に高い転写活性化を示したことから、人工ユニットが細胞内ゲノムを標的とした場合にも機能することがわかった。

本研究では、5'末端塩基に依存しないTALE、及び5mCに選択的に結合するTALEユニットの創製に成功した。これらを活用することで、これまで標的にできなかった配列に結合するTALEを設計できることから、本研究成果はTALEを利用した遺伝子改変技術、エピジェネティクス研究、遺伝子治療など多方面への応用が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

任意の塩基配列に結合するようにデザイン可能な DNA 結合タンパク質は、遺伝子転写制御や遺伝子改変など生命科学技術への応用が可能である。その中でも Transcription activator-like effector (TALE) は、これまで不可能であった簡便な設計が可能な DNA 結合タンパク質として注目されている。申請者はこの TALE に改変を加えることで、その機能を拡張することに取り組んだ。

第一章においては、TALE の 5'末端塩基認識にリピート-1 中の W232 が重要な役割をもつことを示した。また、TALE リピート-1 中のヘアピンループ構造部分をランダム化し、1-ハイブリッドスクリーニングによる選出を行うことで、結合配列の 5'末端塩基が T/A/G/C、いずれの場合でも高い結合活性を示す TALE タンパク質の創製に成功した。これにより、これまで標的にできなかったチミンを含まない DNA 配列に結合する TALE を設計することが可能になった。

第二章では、天然の TALE ユニットの改変を施すことで、代表的な修飾塩基のひとつであるメチル化シトシンに高い選択性で結合する TALE ユニットの創製に成功した。また創製した人工ユニットは内在ゲノム DNA に対しても機能し、これを用いることで内在遺伝子の活性をメチル化状態依存的に制御可能であることを示した。メチル化依存的な結合能を有する TALE は、エピジェネティクス研究を進める上で強力なツールとなると考えられる。

以上のように、本研究成果は新規機能を有する TALE の設計を可能とするものであり、TALE を利用した遺伝子改変技術、エピジェネティクス研究、遺伝子治療など多方面への応用が期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 29 年 2 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。